

Aus dem Institut für Pathophysiologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen Holtz)

**mRNA-Expression endogener Baculovirus homologer Inhibitoren der Apoptose (IAPs) im
insuffizienten Myokard.**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Konstantinos Drogaris
geboren am 02.03.1976 in Palaio Faliro, Athen

Technischer Betreuer: Dr. rer. nat. D. Darmer
Gutachter: Prof. Dr. med. J. Holtz
Prof. Dr. rer. nat. H. Morawietz (Dresden)

Eröffnungsdatum des Promotionsverfahrens: 26.02.2008

Datum der Verteidigung: 17.06.2008

urn:nbn:de:gbv:3-000014364

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014364>]

Ουδέν χρήμα μάτην γίγνεται,
αλλά πάντα εκ λόγου τε και υπ' ανάγκης

Nichts entsteht planlos
sondern aus Sinn und unter Notwendigkeit

(Leukipp von Milet 5 Jh. v. Chr.)

Referat

In den letzten Jahren wurde aus einer Reihe von Arbeiten die herausragende Rolle der Apoptose nicht nur für immunologische Prozesse und in der Krebsforschung sondern auch bei den kardiovaskulären Erkrankungen deutlich. In dieser Arbeit wurde die Rolle der Apoptoseinhibitoren XIAP und hIAP-1 untersucht. Sie sind Teil einer hochkonservierten Proteinfamilie, der Inhibitor of Apoptosis proteins (IAP) und sind in der Lage anhand ihrer BIR Domäne an Caspasen, die zentralen Apoptoseexekutoren, zu binden und ihrer Aktivität zu inhibieren. Zudem können die IAP auch über einer RING Domäne und ihrer Ubiquitin E3 Ligase Eigenschaft die Caspasen eliminieren.

Im Rahmen einer Herztransplantation wurden transmurale, nichtvernarbte, linksventrikuläre Myokardproben von 27 explantierten, terminal insuffizienten Herzen genommen. Das Kontrollmaterial wurde von 20 aus klinischen Gründen nicht transplantierbaren Spenderherzen gewonnen. Alle Patienten hatten zuvor schriftlich über die wissenschaftliche Verwendung des Probematerials eingewilligt. Daraus wurde die Gesamt RNA gewonnen und anhand einer standard kalibrierten kompetitiven RT-PCR Reaktion die mRNA Konzentrationen von XIAP und hIAP-1 bestimmt.

In den Kardiomyozyten herzinsuffizienter Patienten ist Apoptose aktiviert, wird aber nur selten bis zum Auflösen der Zelle durchgeführt. Entgegen unserer initialen Vermutung sind die Apoptoseinhibitoren hIAP-1 und XIAP bei herzinsuffizienten Patienten nicht höher exprimiert sondern herabreguliert und zwar bei Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie stärker als bei Patienten mit einer ischämischer Kardiomyopathie, wobei es eine sehr große interindividuelle Variation gibt. Die mRNA Expression von XIAP und hIAP-1 bei individuellen Patienten korrelierten miteinander.

Die Therapieregimes beeinflussen die Genexpression von hIAP-1 und XIAP auf unterschiedlicher Weise. ACE-Hemmer tendieren zu einer Verminderung der IAP-Herabregulation bei Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie. Betablocker vermindern tendentiell die Herabregulation bei Patienten mit einer dilatativen Kardiomyopathie, aber haben das gegenteilige Effekt bei Patienten mit einer ischämischen Kardiomyopathie. Kalziumantagonisten und Nitrate schließlich verstärken deutlich die Herabregulation der Apoptoseinhibitoren und scheinen somit die Apoptoseaktivität zu verstärken.

*Drogaris, Konstantinos: mRNA-Expression endogener Baculovirus homologer Inhibitoren der Apoptose (IAPs) im insuffizienten Myokard.
Halle, Martin-Luther Universität, Med. Fak., Diss., 78 Seiten, 2008*

I. Inhaltsverzeichnis

Referat

I. Inhaltsverzeichnis	I
II. Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1 Apoptose	1
1.2 Grundlagen der Apoptose	3
1.2.1 Caspasen	3
1.2.2 Caspase Aktivierung	5
1.2.3 Der extrinsische Aktivierungsweg der Apoptose	5
1.2.4 Der intrinsische Aktivierungsweg der Apoptose	10
1.2.5 Die Bcl-2 Proteinfamilie: Regulatoren der mitochondrialen Aktivierung	10
1.2.6 Cytochrom c und Apoptoseaktivierung. Formierung des Apoptosomes	13
1.3 Kardiale Apoptose und die Rolle der IAPs	13
1.3.1 XIAP	15
1.3.2 hIAP-1/hIAP-2	18
1.3.3 Andere Mitglieder der IAP Proteinfamilie	19
1.4 IAP-Antagonisten	21
2. Zielstellung	23
3. Materialien	24
3.1 Chemikalien	24
3.2 Enzyme	25
3.3 Lösungen	25
3.4 Kits	26
3.5 Grossgeräte	27
4. Methoden	28
4.1 Probenmaterial	28
4.2 RNA-Präparation	28
4.3 Reverse Transkription	30
4.4 Aufbau der kompetitiven standard kalibrierten RT-PCR für XIAP und hIAP-1	31
4.4.1 Prinzip der Polymerasenkettenreaktion	32
4.4.2 Auswahl der Primer	34
4.4.3 PCR Ansatz	35
4.4.4 Kompetitive RT-PCR	35
4.4.5 Synthese der Standard DNA-Fragmente für die kompetitive RT-PCR	36
4.4.6 Bestimmung der Molekülzahl der Standard-DNA Fragmente	38

4.4.7	Auswertung der kompetitiven RT-PCR	38
4.5	DNA Gelelektrophorese	39
4.6	Elution von cDNA Fragmenten aus Agarosegelen	40
4.6.1	Elution über semipermeable Membran	41
4.6.2	DNA-Fällung	41
4.7	Klonierung der PCR Fragmenten	41
4.8	Bakterienkulturen und Isolierung der Plasmid DNA	43
4.9	DNA Restriktion	43
4.10	DNA Sequenzierung	44
5.	Ergebnisse	46
5.1	hIAP-1 und XIAP mRNA Konzentrationen bei Herzinsuffizienz	46
5.2	Auswirkung der Pharmakotherapie auf hIAP-1 und XIAP mRNA-Konzentrationen.	50
6.	Diskussion	54
7.	Zusammenfassung	61
8.	Bibliographie	62
Thesen		76
A	Selbständigkeitserklärung	
B	Erklärung über frühere Promotionsversuche	
C	Veröffentlichungen	
D	Tabellarischer Lebenslauf	
E	Danksagung	

II. Abkürzungsverzeichnis

Ax	Absorption (Absorption bei einer Wellenlänge von x nm)
Abb.	Abbildung
AIF	Apoptosis-inducing factor
ANP	Atrio Natriuretisches Peptid
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
ARC	Apoptosis Repressor with Caspase recruitment domain
AS Primer	Antisense Primer
ASK	Apoptosis Signaling Cascade
Bcl-Proteinfamilie	B-cell lymphoma- Proteinfamilie
Bid	
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death
BH 1-4	Bcl-2 Homology domain 1-4
BIR	Baculovirus inhibitory Repeat
BIRC	Baculoviral IAP-repeat-containing
bp	Basenpaar(e)
BRUCE	BIR repeat containing ubiquitin-conjugating enzyme
CARD	Caspase Recruiting Domain
Caspases	Cysteine-dependent aspartate-directed proteases
CDE	Cell Cycle Dependent Elements
cDNA	complementary DNA
cFLIP	cellular Fas-associated Protein with DD-like interleukin-1 β -converting enzyme or caspase-8 inhibitory proteins
CHARMS	Candesartan in Heart Failure: Assessment of Reduction in Mortality and Morbidity Program
CHR	Cell cycle gene Homology Region
cIAP1	cellular IAP 1
cIAP2	cellular IAP 2
CIBIS II	Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II
CONSENSUS	Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study
Cp-IAP	Cydia pomonella-IAP
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
DdNTP	2',3'-Dideoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DCM	Dilatative Cardiomyopathie
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DIABLO/Smac	Direct IAP-binding protein with low pI/ Second mitochondria-derived activator of caspases
DISC	Death inducing signalling complex
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
DR 1-6	Death Receptor 1-6
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

entf.	entfällt
et al.	und andere (lat.)
FADD	Fas associated Death Domain
FLIP	s. cFLIP
HI	Herzinsuffizienz
hIAP-1	Human Inhibitor of Apoptosis Protein-1
hIAP-2	Humaner Inhibitor of Apoptosis Protein-2
hILP	human Inhibitor of apoptosis like protein
HtrA2	High temperature requirement protease A2
GTC	Guanidinthiocyanat
IAPs	Inhibitor of Apoptosis Proteins
IBM	IAP-binding motif
ICM	Ischämische Cardiomyopathie
IL	Interleukin
ILP 2	Inhibitor of apoptosis like protein 2
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactoside
JNK	Jun amino kinase
Kap.	Kapitel
Kb	Kilobasen(paare)
kDa	Kilodalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
KIAP	Kindney Inhibitor of Apoptosis Protein
MAPK	Mitogen activated Protein Kinases
ME	β -Mercaptoethanol
MERIT-HF	Metoprolol Randomized Intervention Trial in Congestive Heart Failure
MIHA	Mammalian IAP Homologue A
MIHB	Mammalian IAP Homologue B
MIHC	Mammalian IAP Homologue C
ML-IAP	Melanoma Inhibitor of Apoptosis Protein
MOMP	Mitochondrion Outer Membrane Permeabilization
MPTP	Mitochondrion Permeabilitä Transitino Pore
mRNA	messenger RNA
NF κ B	nuclear factor κ B
NGFR	Nerve Growth Factor Receptor
NIK	Nuclear factor κ B-inducing Kinase
Op-IAP	Orgyia Pseudotsugata-IAP
ORF	Open Reading Frame
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
Puma	p53 up-regulated modulator of apoptosis
RING	really interesting new gene
RIP 1	Rezeptor-interacting-Protein 1
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	Reactive Oxygen Species
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
S Primer	Sense Primer
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspases
SOLVD-T	Studies of left ventricular dysfunction-Therapy
TAB1	TAK1-binding protein 1
TAK1	TGF β -activated protein kinase 1
Tan	Annealing Temperature

TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TGF β	Transforming growth factor β
TNF-R1	Tumor Necrosis Factor Receptor 1
TRADD	TNF-R1-associated-Death Domain
TRAF 2	TNF-R-associated-Factor 2
TRAIL	TNF related apoptosis inducing ligand
TRAIL Rezeptor 1	TNF related apoptosis inducing ligand Rezeptor 1
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSPE-Puffer	Tris-Sarcosyl-Phenol-Na-EDTA Puffer
U	Enzymeinheiten
UBC	Ubiquitin conjugating enzyme
V	Volt
Vol	Volumen
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein